

02217196

SYNTHESIS OF N-ACETYL LACTOSAMINE BY COMPOSITE ENZYME

PUB. NO.: 62-134096 ✓ [JP 62134096 A]  
PUBLISHED: June 17, 1987 (19870617)  
INVENTOR(s): IDEIE SAKANORI  
AMAYA MIEKO  
KAWANISHI NORIO  
APPLICANT(s): SNOW BRAND MILK PROD CO LTD [000669] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 60-275162 [JP 85275162]  
FILED: December 09, 1985 (19851209)  
INTL CLASS: [4] C12P-019/26; C12P-019/26; C12R-001/88  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 11.4 (AGRICULTURE -- Food Products); 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)  
JAPIO KEYWORD: R059 (MACHINERY -- Freeze Drying)  
JOURNAL: Section: C, Section No. 460, Vol. 11, No. 365, Pg. 2,  
November 27, 1987 (19871127)

ABSTRACT

PURPOSE: To prepare the aimed substance, by reacting a microorganism having the ability to produce uridine diphosphate galactose and cow's milk galactosyltransferase with a substrate containing uridine monophosphate, galactose and N-acetylglucosamine.

CONSTITUTION: A microorganism, e.g. *Torulopsis holmii*, etc., belonging to the genus *Torulopsis* and having the ability to produce uridine diphosphate galactose and cow's milk galactosyltransferase are simultaneously reacted with a substrate containing 5'-uridine monophosphate, galactose and N-acetylglucosamine. Thereby reaction of 5'-uridine monophosphate with galactose into uridine diphosphate galactose and reaction forming the titled substance from the above-mentioned substance and N-acetylglucosamine with cow's milk galactosyltransferase are carried out in the same system. The reactions are carried out at 4-9pH and 5-40 deg.C temperature for 2-6 days.

## ⑪ 公開特許公報 (A) 昭62-134096

⑤Int.Cl.  
C 12 P 19/26  
// C 12 P 19/26  
C 12 R 1:88

識別記号 厅内整理番号  
8515-4B

④公開 昭和62年(1987)6月17日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑤発明の名称 複合酵素系によるN-アセチルラクトサミンの合成法

②特 願 昭60-275162

②出 願 昭60(1985)12月9日

特許法第30条第1項適用 昭和60年5月10日 社団法人日本農芸化学会発行の日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集により発表

⑦発明者 出 家 栄 記	狭山市入間川2丁目23番5号102
⑦発明者 天 谷 三 枝 子	札幌市中央区南11条西8丁目545番地
⑦発明者 川 西 倖 生	小山市天神町1-4-25 一徳ハイツ2-311
⑦出願人 雪印乳業株式会社	札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
⑦代理 人 弁理士 宮田 広豊	

## 明細書

## 1. 発明の名称

複合酵素系によるN-アセチルラクトサミンの合成法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 5'-ウリジンモノリン酸、ガラクトースおよびN-アセチルグルコサミンを含む基質に、トルロアズテス菌によるウリジンジリン酸ガラクトース産生能を有する微生物と牛乳ガラクトシルトランスクエラーゼを同時に作用させて上記微生物による5'-ウリジンモノリン酸とガラクトースからのウリジンジリン酸ガラクトースの合成反応と、牛乳ガラクトシルトランスクエラーゼによるウリジンジリン酸ガラクトースとN-アセチルグルコサミンからのN-アセチルラクトサミンの合成反応とを同一系内で行うこと

を特徴とするN-アセチルラクトサミンの合成法。

(2) 同一系内の上記二合成反応を、pH 4~9、温度 5~10℃において2~6日間行う特許請求

の範囲第10項記載の合成法。

## 3. 発明の詳細な説明

実施上の利用分野

本発明は、母乳中に含まれているオリゴ糖の一種であるN-アセチルラクトサミンを、複合酵素系による同一系内の反応により短時間で合成するための方法に関する。

従来の技術

N-アセチルラクトサミン(以下LacNACと記す)は、人乳オリゴ糖あるいは初生ハシ質、糖脂質の糖鎖中に含まれる、ガラクトースとN-アセチルグルコサミンがβ1,4結合した2糖類であつて、腸内におけるビフィズス菌の増殖活性を有していて優れた整腸作用を示すことから、育児用調製粉乳のような高度栄養食品への利用上重要視されている。

ところで、従来、LacNACの合成法については、Brew et al. の報告 プロシーデングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス

・オブ・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. , 59, 491 , 1968) がある。この方法は、ウリジンジリン酸ガラクトースとN-アセチルグルコサミンを基質として、これに牛乳由来の牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼを作用させてLacNAcを合成することから成る。

しかし、この合成法は、基質として用いるウリジンジリン酸ガラクトースが高価であるため、工業的規模での合成法としては実用性に乏しい。

一方、基質であるウリジンジリン酸ガラクトースの製造法として、ウリジンモノリン酸とガラクトースを含む反応液に、サツカロミセス属、キヤンディダ属、トルロブシス属もしくはブレタノマイセス属に属する微生物の菌体もしくは乾燥固体等を作用させることにより、ウリジンジリン酸ガラクトースを比較的で高収率で合成する方法 (特公昭47-1837号) が提案されている。

しかし、上記方法を利用してLacNAcを合成するには、該方法で得られたウリジンジリン酸ガラク

トースとN-アセチルグルコサミンを基質とし、これに牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼを作用させて反応させるという2工程の組合せが必要となり、各工程毎での作業管理を別々に行うこと必要となるので工業上有利な合成法とは言えない。

#### 発明が解決しようとする問題点

本発明者らは、LacNAcを工業的に一そう効率よく合成するための方法について検討した結果、LacNAcを1工程で効率よく合成し得る方法を達成し、本発明をなすに至つた。

すなわち、本発明の目的は、複合酵素系を用いてウリジンジリン酸ガラクトースの合成反応とLacNAcの合成反応を同一系内で行うことにより、LacNAcを1工程で極めて短時間で効率よく合成するための方法を提供することにある。

因に、従来の2工程方式では、ウリジンリン酸ガラクトースを反応液からイオン交換樹脂を用いて精製する必要があり、反応開始からウリジンリ

ン酸ガラクトースを得るのに10日間以上を要する。  
以下本発明を詳しく説明する。

#### 発明の構成

本発明の特徴は、5'-ウリジンモノリン酸、ガラクトースおよびN-アセチルグルコサミンを含む基質に、トルロブシス属に属するウリジンジリン酸ガラクトース産生菌を用いた微生物と牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼを同時に作用させ、アセチルガラクトサミンを合成することにある。

#### 問題点を解決するための手段

本発明において用いる微生物は、トルロブシス属に属する酵母であつて、菌体自体、菌体培養物、菌体抽出物もしくは乾燥固体等の形態で使用し得る。ここで利用する微生物としてはトルロブシス・ホルミイー (*Torulopsis Holmii*) IFO-5 (微生物第5766号) 、トルロブシス・キヤンディタ (*Torulopsis caadida*) IFO-0768 を例示できる。

これらの微生物の培養はその特性に応じて行われるが、通常の微生物の培養に用いられる培地中

で行われる。例えば、炭素源として可溶性デンプン、乳糖、グルコース、ガラクトース、ショ糖等、窒素源としてペプトン、肉エキス、酵母抽出物を含む培地を用いることができる。

また、本発明で用いられる牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼは、牛乳から採取、精製したものが用いられるが、必ずしも高度に精製したものでなくともよく、部分精製したものでも有効に用い得る。

本発明では、上記微生物および牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼを、5'-ウリジンモノリン酸、ガラクトースおよびN-アセチルグルコサミンを含む反応基質に同時に添加して作用させる。この場合、反応基質のpHを4~9、温度5~40℃に保持して2~6日間作用させることが好ましい。また、反応基質における各原料物質は、ウリジンモノリン酸を0.5~4g%、ガラクトースを3~6g%、リン酸緩衝液2~4g%及びN-アセチルグルコサミンを100~300mM濃度となし、上記計

母(乾燥固体として)を10~20g %および牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼ 1~5g %の割合の組成にすることが好ましい。なお、基質にはリン酸供与体(リン酸として)200~400mモル濃度および酵母の生育促進物質としてマグネシウム塩( $MgSO_4$ として)10~30 mモル濃度の割合で添加する。ここで $Mg^{2+}$ は酵母のエネルギー生成反応に関与する酵素を活性化する。

上記基質に酵母と牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼを同時に添加して作用させると、酵母の作用によるウリジンモノリン酸とガラクトースからのウリジンジリン酸ガラクトースの合成反応と、牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼによるウリジンジリン酸ガラクトースとN-アセチルグルコサミンからのLacNACの合成反応が同一系内で行われ、LacNACが従来の2工程の組合せから成る方法に比べて非常に短時間で合成される。

このような複合酵素系を同時に作用させることにより、上記両反応が同一系内で効率的に行われ

るのは、本発明で利用する微生物の特性に因るものと推定されるが、LacNAC合成上の従来の技術水準からは予期し得ないことである。

上述のようにして得られたLacNACは、必要に応じてイオン交換樹脂および活性炭で処理して分離、精製される。

以下に実施例を示して本発明を更に具体的に説明する。

#### 実施例

##### 乾燥酵母の調製

トルロブシス・ホルマイーKY-5株(Torulopsis holmi KY-5)微研菌番号第5766号を、ガラクトース 50g 、ペプトン 5g 、酵母エキス 5g 、リン酸-1-カリウム 2g 、リン酸-2-アムモニウム 2g 、および硫酸マグネシウム7水和物 1g を含む培養液 1L に接種して、30℃で72時間振とう培養した。培養終了後に、8000G で30分間遠心分離して集団し、1L の水を加えて数回洗浄した後、凍結乾燥して乾燥酵母 30g を調製した。

##### 牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼの調製

4L の脱脂乳に40L の蒸留水を加えて、これに乾燥 CM-セファデックス C-50 20g を加えて酵酸で pH 6.5 に調整した。

次に、上記混合液を通過して得たゲルを 2L の 0.02モル濃度食塩で洗浄後、カラム(Φ10×40cm)に充填し、0.1モル濃度2-メチルグルタル酸ナトリウム(pH 8.0)で溶出しした。この溶出により得られた活性を有する部分を集め、これに等容の硫酸銅溶液を加えて生じた沈殿を 8,000G で15分間遠心分離して集めた。沈殿物に少量の水を加えて溶解して透析した後、凍結乾燥して牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼ 200mg を調製した。

##### LacNACの合成反応

5%ウリジンモノリン酸 1.0g %、ガラクトース 3.6g %、リン酸緩衝液 2g %、硫酸マグネシウム 0.14g %、N-アセチルグルコサミン 3.4g %、上記の方法で調製した乾燥酵母 10g %および牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼ 1.5g %を含む

混液 10mL を、30℃で5日間反応させた。反応により反応液 100mL 当り、1.5g %のLacNACが合成された。

##### 分離精製

前記の条件で反応させて得られた反応混合液 10mL を、0.45μmメンブランで通過して固体成分を除いた後、ダウエツクス 1×2(C1型)カラム(Φ10×10cm)に通じて核酸を除いた。

次に得られた液を活性脱ゼオライト(2:1)カラム(Φ10×30cm)に通じて十分量の水を流して未反応のガラクトース-N-アセチルグルコサミンを除いた後、50%アルコール 2L を通じてLacNACを溶出させた。溶出液を濃縮乾燥して白色粉末 130mg を得た。この標品中のLacNAC純度は 92% であつた。

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮田 広豊